



1FW

ATTORNEY DOCKET No.: 2003946-0080 (FP04-0096-00US-XX)

**IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

Applicant: Yamamoto *et al.*  
Serial No: 10/797,903  
Filing Date: March 10, 2004  
Title: c-KIT KINASE INHIBITOR

Examiner: To be assigned  
Group Art Unit: 3612

Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450  
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

**TRANSMITTAL OF CERTIFIED PRIORITY DOCUMENTS**


Enclosed herewith please find the documents listed below:

- 1) Certified copy of Japanese Application No. 2003-062823, filed March 10, 2003; (26 pages);
- 2) Certified copy of Japanese Application No. 2003-302803, filed August 27, 2003; (18 pages); and
- 3) Return Postcard.

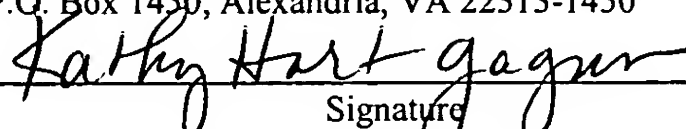
As indicated in the Preliminary Amendment that was filed with the above-references application on March 10, 2004, the present application claims priority under 35 U.S.C. § 119 to Japanese Applications No. 2003-062823 and 2003-302803. Certified copies of these applications are being filed herewith in order to perfect those priority claims. Please charge any fees associated with this filing, or apply any credits, to our Deposit Account No. 03-1721.

Respectfully submitted,

Dated: June 18, 2004

  
Charles E. Lyon, D.Phil.  
Limited Recognition Under 37 C.F.R. § 10.9(b)

CHOATE, HALL & STEWART  
Exchange Place  
53 State Street  
Boston, MA 02109  
Tel: (617) 248-5150  
Fax: (617) 248-4000

Certificate of Mailing	
I certify that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service with sufficient postage as First Class Mail in an envelope addressed to Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450	
June 18, 2004	
Date	Signature
Kathy Hart Gagnon	
Typed or Printed Name of person signing certificate	

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application: 2003年 3月10日

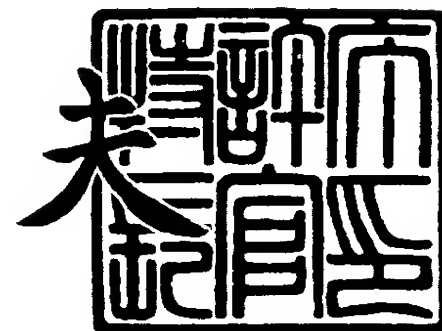
出願番号  
Application Number: 特願2003-062823  
[ST. 10/C]: [J.P. 2003-062823]

出願人  
Applicant(s): エーザイ株式会社

2004年 4月26日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 EP03TH0301

【提出日】 平成15年 3月10日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C07D213/74

【発明者】

    【住所又は居所】 茨城県つくば市稲荷前 9 - 7 - 2 1 0

    【氏名】 山本裕之

【発明者】

    【住所又は居所】 千葉県印西市木下東 4 - 1 4 - 9

    【氏名】 渡辺達夫

【発明者】

    【住所又は居所】 茨城県つくば市松代 4 - 6 - 1 8

    【氏名】 岡田雅之

【発明者】

    【住所又は居所】 茨城県つくば市吾妻 3 - 1 9 - 1   パークヒル吾妻 2 - 2 0 3

    【氏名】 鶴岡 明彦

【特許出願人】

    【識別番号】 000000217

    【氏名又は名称】 エーザイ株式会社

    【代表者】 内藤 晴夫

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 004983

    【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

    【物件名】 明細書   1

    【物件名】 図面   1

    【物件名】 要約書   1

【プルーフの要否】 要

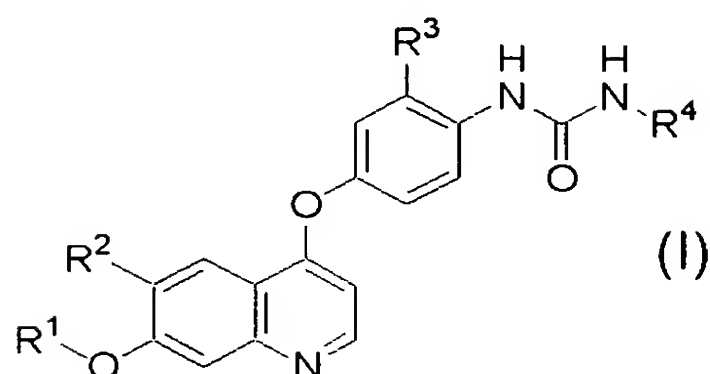
【書類名】 明細書

【発明の名称】 c-Kitキナーゼ阻害剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 一般式I、

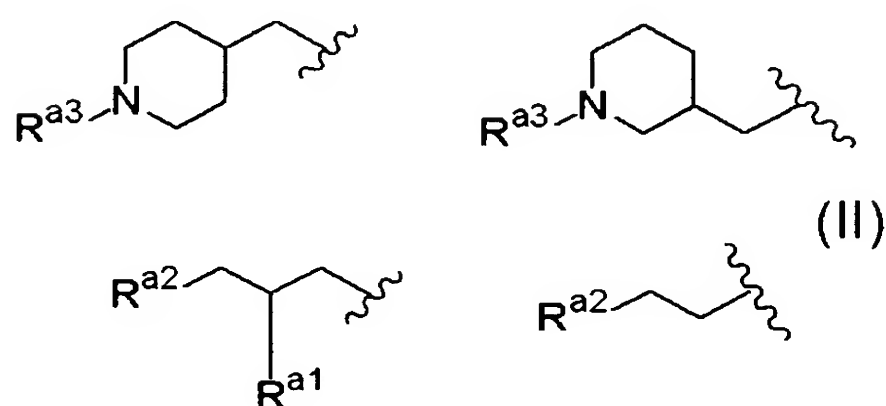
【化 1】



〔式I中、

R<sup>1</sup> はメチル基、2-メトキシエチル基または式II

【化 2】



(式II中、R<sup>a3</sup> はメチル基、シクロプロピルメチル基またはシアノメチル基を意味する；R<sup>a1</sup> は水素原子、フッ素原子または水酸基を意味する；R<sup>a2</sup> は、1-ピロリジニル基、1-ピペリジニル基、4-モルフォリニル基、ジメチルアミノ基またはジエチルアミノ基を意味する。) の何れかで表される基を意味する；

R<sup>2</sup> はシアノ基または式-CONHR<sup>a4</sup> (式中、R<sup>a4</sup> は水素原子、C<sub>1</sub>-6アルキル基、C<sub>3</sub>-8シクロアルキル基、C<sub>1</sub>-6アルコキシ基またはC<sub>3</sub>-8シクロアルコキシ基を意味する。) で表される基を意味する；

R<sup>3</sup> は水素原子、メチル基、トリフルオロメチル基、塩素原子またはフッ素原子を意味する；

R<sup>4</sup> は水素原子、メチル基、エチル基、n-プロピル基、シクロプロピル基、2

ーチアゾリル基または4-フルオロフェニル基を意味する。) で表される化合物もしくはその塩またはそれらの水和物を有効成分とするc-Kitキナーゼ阻害剤。

【請求項2】 一般式I中、 $R^1$  がメチル基である請求項1記載のc-Kitキナーゼ阻害剤。

【請求項3】 一般式I中、 $R^4$  がメチル基、エチル基またはシクロプロピル基である請求項1または2記載のc-Kitキナーゼ阻害剤。

【請求項4】 一般式I中、 $R^3$  が水素原子、塩素原子またはフッ素原子である請求項1～3いずれか1項に記載のc-Kitキナーゼ阻害剤。

【請求項5】 一般式I中、 $R^2$  が式 $-CONHR^{a4}$  (式中、 $R^{a4}$  は水素原子またはメトキシ基を意味する。) で表される基である、請求項1～4いずれか1項に記載のc-Kitキナーゼ阻害剤。

【請求項6】 一般式Iで表される化合物が、

(1) 4-(3-クロロ-4-(シクロプロピルアミノカルボニル) アミノフェノキシ)-7-メトキシ-6-キノリンカルボキサミド、

(2) 4-(3-クロロ-4-(エチルアミノカルボニル) アミノフェノキシ)-7-メトキシ-6-キノリンカルボキサミド、

(3) N6-メトキシ-4-(3-クロロ-4-( (シクロプロピルアミノ) カルボニル) アミノ) フェノキシ)-7-メトキシ-6-キノリンカルボキサミドおよび

(4) N6-メトキシ-4-(3-クロロ-4-( (エチルアミノ) カルボニル) アミノ) フェノキシ)-7-メトキシ-6-キノリンカルボキサミドから選ばれるいずれか1の化合物である、請求項1～5いずれか1項に記載のc-Kitキナーゼ阻害剤。

【請求項7】 請求項1～6いずれか1項に記載のc-Kitキナーゼ阻害剤を有効成分とする、c-Kitキナーゼを過剰発現する、あるいは変異型c-Kitキナーゼを発現する癌を治療する抗癌剤。

【請求項8】 c-Kitキナーゼを過剰発現する、あるいは変異型c-Kitキナーゼを発現する癌が、急性骨髄性白血病、肥満細胞性白血病、小細胞肺癌、GIST、睾丸腫瘍、卵巣癌、乳癌、脳腫瘍、神経芽細胞腫あるいは大腸癌である請求項7に記

載の抗癌剤。

【請求項 9】 c-Kit キナーゼを過剰発現する、あるいは変異型 c-Kit キナーゼを発現する癌が、急性骨髄性白血病、小細胞肺癌あるいは GIST である請求項 7 に記載の抗癌剤。

【請求項 10】 患者から取り出した癌細胞が c-Kit キナーゼを過剰発現する、あるいは変異型 c-Kit キナーゼを発現することを確認した後に投与することの特徴とする、請求項 7 ～ 9 いずれか 1 項に記載の抗癌剤。

【請求項 11】 請求項 1 ～ 6 いずれか 1 項に記載の c-Kit キナーゼ阻害剤を有効成分とする、肥満細胞症、アレルギーあるいは喘息の治療剤。

#### 【発明の詳細な説明】

#### 【0001】

#### 【発明の属する技術分野】

本発明は、式 I に記載の c-Kit キナーゼ阻害活性を有する化合物を有効成分とする、c-Kit キナーゼの過剰な活性化により引き起こされた疾患の治療剤に関する。

#### 【従来の技術】

受容体型チロシンキナーゼによる細胞内情報伝達は、細胞増殖、分化および代謝に寄与し、その結果癌を始めとした種々の疾患の原因となっている（非特許文献 1，2）。

受容体型チロシンキナーゼの一つである c-Kit キナーゼは、それに対する特異的なリガンドである SCF (Stem cell factor) と結合することにより、それ自身の 2 量体化に引き続きキナーゼ活性が活性化され、その結果細胞内に存在する種々の c-Kit キナーゼの基質がリン酸化を受けることが知られている（非特許文献 3，4）。

#### 【0002】

c-Kit キナーゼの異常な活性化は、ある種（例を下記に記載）の癌細胞で増殖シグナルとなって癌化や悪性化の原因になっていると考えられている。

(1). 急性骨髄性白血病 (acute myelogenous leukemia, AML) : 多くの (60-80%) 急性骨髄性白血病の患者で c-Kit キナーゼの発現が見られ、それらの患者由来の

芽球の増殖がSCF刺激で促進された。更に、13/18例の患者において、SCF刺激無しでc-Kitキナーゼの活性化が見られ、これらの患者ではc-Kitキナーゼに活性化変異が生じていると考えられた（非特許文献4～8）。

(2). 肥満細胞性白血病 (mast cell leukemia) : 肥満細胞症患者が発症する肥満細胞性白血病の細胞株においてc-Kitキナーゼの活性化変異の存在が報告されている（非特許文献9）。

#### 【 0 0 0 3 】

(3). 小細胞肺癌 (small cell lung carcinom, SCLC) : SCLCの70%以上の細胞株でc-Kitキナーゼの高発現が見られた。一方、非小細胞肺癌 (Non-small cell lung carcinoma) の細胞株ではc-Kitキナーゼの発現量は少ないか検出限界以下であった。また小細胞肺癌の細胞株ではリガンドであるSCFも発現しており、オートクラインで増殖が促進されている可能性が示唆された（非特許文献10, 11）。

(4). GIST (gastrointestinal stromal tumors) : GISTはc-Kitキナーゼを発現している消化管に発生する間質系癌と定義される。GISTでは約半数で活性化変異が見られ、この変異は悪性度の高いGISTにおいてより高頻度に存在しており、予後因子となる可能性が示唆されている（非特許文献12, 13）。

#### 【 0 0 0 4 】

(5). 睾丸腫瘍 (testicular cancer) : 睾丸腫瘍は、前癌病変と考えられるcarcinoma in situ (CIS) が進行してseminomaとnon-seminoma と呼ばれる腫瘍になる。C-Kitキナーゼは、CISとseminomaにおける高発現が報告されている（非特許文献14）。更に近年、seminomaにおいて活性化変異を起こしたc-Kitキナーゼの発現が報告されている（非特許文献15）。

(6). 卵巣癌 (ovarian cancer) : 正常の卵巣上皮ではSCFが発現しているだけでc-Kitキナーゼの発現が見られないが、癌化初期で良性の卵巣癌ではc-KitキナーゼおよびSCFの両方が発現し、更に悪性化した卵巣癌では逆にc-Kitキナーゼの発現が低下する事が報告されている。この結果より、c-Kitキナーゼが卵巣癌の発生に重要な役割を果たしていることが示唆された（非特許文献16）。

#### 【 0 0 0 5 】



(7).乳癌 (breast cancer) : 乳癌は周囲の正常組織に比べc-Kitキナーゼの発現が低下するという報告が有る (非特許文献 1 7) が、その後の研究で乳癌では正常組織で検出されなかったc-Kitキナーゼの発現が見られ、更にSCFの発現も検出され、オートクライン刺激で増殖が促進されている事が示唆された (非特許文献 1 8) 。

(8).脳腫瘍 (brain cancer) : 脳腫瘍の中で最も悪性度の高い神経膠芽腫 (glioblastoma) の細胞株および組織においてc-Kitキナーゼの発現が見られ、c-Kitキナーゼを発現する神経膠芽腫の細胞株がSCF刺激により増殖が促進されたことが報告されている (非特許文献 1 9) 。

#### 【 0 0 0 6 】

(9) 神経芽細胞腫 (neuroblastoma) : 子供に発生する癌として有名な神経芽細胞腫の細胞株および組織標本において、SCFとc-Kitキナーゼが共に発現している例が多く、抗c-Kitキナーゼ抗体により神経芽細胞腫の細胞株の増殖が抑制され、オートクラインにより増殖が促進されている事が報告されている (非特許文献 2 0) 。

(10).大腸癌 (colorectal cancer) : c-KitキナーゼとそのリガンドであるSCFは大腸癌組織における共発現が見られたのに対し正常粘膜組織では両者の発現が見られなかった。また大腸癌細胞株はSCF刺激により増殖が促進された。(非特許文献 2 1) 。

#### 【 0 0 0 7 】

また、SCF刺激によるc-Kitキナーゼの活性化が肥満細胞の増殖と分化に必須である事が報告されている (非特許文献 2 2, 2 3) 。従って、c-Kitキナーゼの過剰な活性化は、肥満細胞の過剰によって引き起こされる肥満細胞症、喘息、慢性鼻炎などの免疫異常の原因となっていると考えられている。

(1).肥満細胞症 (Mastcytosis) : 肥満細胞の過剰増殖によって特徴付けられる色々な状態の病態の総称である。(非特許文献 2 4, 2 5) 。肥満細胞症患者では、1)c-Kitキナーゼの過剰発現 (非特許文献 2 6) 、2)可溶性SCF量の増加 (非特許文献 2 7) 、3)c-Kitキナーゼの活性化変異 (非特許文献 2 8, 2 9) などが報告されており、これらがc-Kitキナーゼを過剰に活性化して肥満細胞症を引

き起こすと考えられている。

【 0 0 0 8 】

(2). アレルギー、喘息：肥満細胞と好酸球は炎症、アレルギー、喘息などの発症において重要な細胞である（非特許文献 3 0, 3 1）。この事は慢性鼻炎やアレルギーに伴う炎症に対して現在最も効果が有るとされているコルチコステロイドが、循環および浸潤する肥満細胞と好酸球の数を減少させるという報告からも示唆される（非特許文献 3 2, 3 3）。SCF刺激に伴うc-Kitキナーゼの活性化は、肥満細胞の分化、生存、増殖に必須であるだけでなく、mast cellからの種々の因子の誘導を促進し、これらの因子が好酸球の分化、生存、浸潤性に重要な機能を果たしている事が報告されている（非特許文献 3 4 ~ 3 9）。従ってc-Kitキナーゼの阻害により喘息、アレルギーなどの患者において、活性化した肥満細胞と好酸球を阻害できると考えられる。

【 0 0 0 9 】

以上に述べた通り、c-Kitキナーゼは幾つかの癌の発生や悪性化や、肥満細胞の過剰が原因と考えられる疾患に密接に関係していると考えられ、その阻害剤は、これら疾患の治療剤として有用であると考えられた。

【 0 0 1 0 】

【非特許文献 1】

Kolibaba K. S. et al., B.B.A. 1333, F217-F248, 1997

【非特許文献 2】

Sheijen B. et al., Oncogene 21, 3314-3333, 2002

【非特許文献 3】

Blume-Jensen P. et al., EMBO J. 10, 4121-4128, 1991

【非特許文献 4】

Lev S. et al., EMBO J., 10, 647-654, 1991

【非特許文献 5】

Wang C. et al. Leukemia 3, 699-702, 1989

【非特許文献 6】

Kanakura Y. et al. Leuk. Lymph. 10, 35-41, 1993

## 【非特許文献 7】

Ikeda H. et al. Blood, 78, 2962- 2968, 1991

## 【非特許文献 8】

Ikeda H. et al. Exp. Hematol. 21, 1686-1694, 1993

## 【非特許文献 9】

Furitsu T. et al., J. Clin. Invest., 92, 1736-1744, 1993

## 【非特許文献 1 0】

Hibi K. et al., Oncogene, 6, 2291-2296, 1991

## 【非特許文献 1 1】

Sekido Y. et al., Cancer Res., 51, 2416-2419, 1991

## 【非特許文献 1 2】

Lasota J. et al., Am. J. Pathol., 157, 1091-1095, 2000

## 【非特許文献 1 3】

Taniguchi M. et al., Cancer Res., 59, 4297-4300, 1999

## 【非特許文献 1 4】

Strohmeyer T. et al., Cancer Res., 51, 1811-1816, 1991

## 【非特許文献 1 5】

Tian Q., et al. Am. J. Pathol., 154, 1643-1647, 1999

## 【非特許文献 1 6】

Tonary A.T., Int. J. Cancer, 89, 242-250, 2000

## 【非特許文献 1 7】

Natali P. et al., Int. J. Cancer, 52, 713-717, 1992

## 【非特許文献 1 8】

Hines S.J. et al., Cell Growth & Differentiation, 6, 769-779, 1995

## 【非特許文献 1 9】

Berdel W.E. et al., Cancer Res., 52, 3498-3502, 1992

## 【非特許文献 2 0】

Cohen P.S., Blood, 84, 3465-3472, 1994

## 【非特許文献 2 1】

Bellone G., et al. J. Cell. Physiol., 172, 1-11, 1997

【非特許文献 2 2】

Hamel et al., J. Neuro-Onc., 35, 327-333, 1997

【非特許文献 2 3】

Kitamura et al., Int. Arch. Aller. Immunol., 107, 54-56, 1995

【非特許文献 2 4】

Metcalf, J. Invest. Derm., 93, 2S-4S, 1991

【非特許文献 2 5】

Golkar et al., Lancet, 349, 1379-1385, 1997

【非特許文献 2 6】

Nagata et al., Mastocytosis Leuk., 12, 175-181, 1998

【非特許文献 2 7】

Longley et al., New Engl. J. Med., 328, 1302-1307, 1993

【非特許文献 2 8】

Nagata et al. Mastocytosis Leuk., 12, 175-181, 1998

【非特許文献 2 9】

Longley et al., Nat. Gen., 12, 312-314, 1996

【非特許文献 3 0】

Thomas et al. Gen. Pharmacol., 27, 593-597, 1996

【非特許文献 3 1】

Metcalf et al. Physiol. Rev., 77, 1033-1079, 1997

【非特許文献 3 2】

Naclerio et al., JAMA, 278, 1842-1848, 1997

【非特許文献 3 3】

Meltzer, Aller. 52, 33-40, 1997

【非特許文献 3 4】

Okayama et al., Int. Arch. Aller. Immunol., 114, 75-77, 1997

【非特許文献 3 5】

Okayama et al., Eur. J. Immunol., 28, 708-715, 1998

## 【非特許文献 3 6】

Metcalf et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 95, 6408-6421, 1998

## 【非特許文献 3 7】

Kay et al., Int. Arch. Aller. Immunol., 113, 196-199, 1997

## 【非特許文献 3 8】

Hogaboam et al. J. Immunol. 160, 6166-6171, 1998

## 【非特許文献 3 9】

Luckas et al. J. Immunol. 156, 3945-3951, 1996

## 【0 0 1 1】

## 【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、c-Kitキナーゼ阻害活性を示す新たな化合物を見出し、c-Kitキナーゼが原因となっている疾患の治療剤を開発することにある。

## 【0 0 1 2】

## 【課題を解決するための手段】

c-Kitキナーゼ阻害作用を示す化合物として、これまでにインドリン骨格を有する化合物が、報告されている (WO 01/45689)。また、キナゾリン骨格を有する化合物のc-Kitキナーゼ阻害作用が報告され (WO 01/47890)、類縁の化合物 (KRN633) もc-Kitキナーゼ阻害作用を持つことが報告されている (久保和生ら、第22回メディシナルケミストリーシンポジウム講演要旨集p275-277, 2P-320, 2002)。

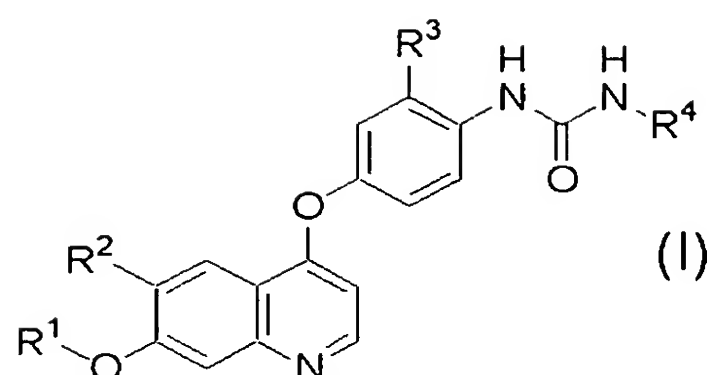
我々は、式Iに記載の化合物がVEGF受容体のkinase活性を抑制し、VEGF, FGF2, HGF刺激による内皮細胞の管腔形成を阻害することを報告した (WO 02/32872)。そして、式Iに記載の化合物がVEGF kinaseのみならず、c-Kitキナーゼに対し強い阻害作用を有する事を見出し、更にc-Kitキナーゼを発現する癌細胞に対して増殖を抑制する活性を有することを見出した。

## 【0 0 1 3】

すなわち本発明は、以下に関する。

1. 一般式I、

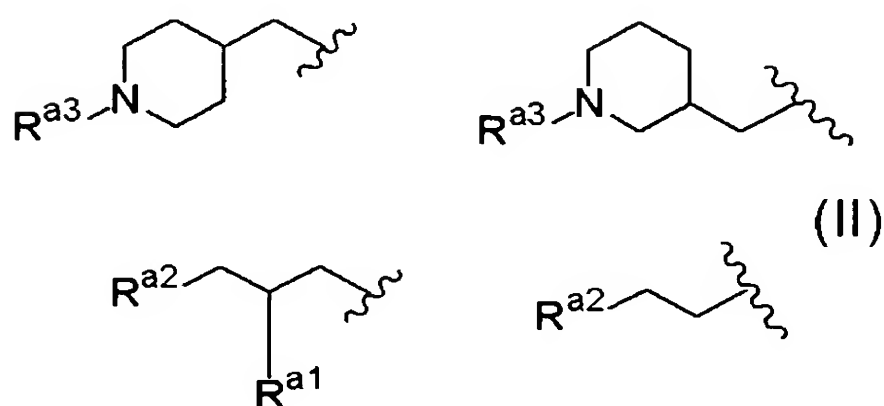
## 【化3】



〔式I中、

R<sup>1</sup> はメチル基、2-メトキシエチル基または式II

## 【化4】



(式II中、R<sup>a3</sup> はメチル基、シクロプロピルメチル基またはシアノメチル基を意味する；R<sup>a1</sup> は水素原子、フッ素原子または水酸基を意味する；R<sup>a2</sup> は、1-ピロリジニル基、1-ピペリジニル基、4-モルフォリニル基、ジメチルアミノ基またはジエチルアミノ基を意味する。) の何れかで表される基を意味する；

R<sup>2</sup> はシアノ基または式-CONHR<sup>a4</sup> (式中、R<sup>a4</sup> は水素原子、C<sub>1</sub>-6アルキル基、C<sub>3</sub>-8シクロアルキル基、C<sub>1</sub>-6アルコキシ基またはC<sub>3</sub>-8シクロアルコキシ基を意味する。) で表される基を意味する；

R<sup>3</sup> は水素原子、メチル基、トリフルオロメチル基、塩素原子またはフッ素原子を意味する；

R<sup>4</sup> は水素原子、メチル基、エチル基、n-プロピル基、シクロプロピル基、2-チアゾリル基または4-フルオロフェニル基を意味する。) で表される化合物もしくはその塩またはそれらの水和物を有効成分とするc-Kitキナーゼ阻害剤。

2. 一般式I中、R<sup>1</sup> がメチル基である1記載のc-Kitキナーゼ阻害剤。

3. 一般式I中、R<sup>4</sup> がメチル基、エチル基またはシクロプロピル基である1ま

たは 2 記載の c-Kit キナーゼ阻害剤。

4. 一般式 I 中、 $R^3$  が水素原子、塩素原子またはフッ素原子である 1～3 いずれか 1 項に記載の c-Kit キナーゼ阻害剤。

5. 一般式 I 中、 $R^2$  が式  $-\text{CONHR}^a$  (式中、 $R^a$  は水素原子またはメトキシ基を意味する。) で表される基である、1～4 いずれか 1 項に記載の c-Kit キナーゼ阻害剤。

6. 一般式 I で表される化合物が、

(1) 4-(3-クロロ-4-(シクロプロピルアミノカルボニル)アミノフェノキシ)-7-メトキシ-6-キノリンカルボキサミド、

(2) 4-(3-クロロ-4-(エチルアミノカルボニル)アミノフェノキシ)-7-メトキシ-6-キノリンカルボキサミド、

(3) N6-メトキシ-4-(3-クロロ-4-(シクロプロピルアミノ)カルボニル)アミノ)フェノキシ)-7-メトキシ-6-キノリンカルボキサミドおよび

(4) N6-メトキシ-4-(3-クロロ-4-(エチルアミノ)カルボニル)アミノ)フェノキシ)-7-メトキシ-6-キノリンカルボキサミドから選ばれるいずれか 1 の化合物である、1～5 いずれか 1 項に記載の c-Kit キナーゼ阻害剤。

7. 1～6 いずれか 1 項に記載の c-Kit キナーゼ阻害剤を有効成分とする、c-Kit キナーゼを過剰発現する、あるいは変異型 c-Kit キナーゼを発現する癌を治療する抗癌剤。

8. c-Kit キナーゼを過剰発現する、あるいは変異型 c-Kit キナーゼを発現する癌が、急性骨髄性白血病、肥満細胞性白血病、小細胞肺癌、GIST、睾丸腫瘍、卵巣癌、乳癌、脳腫瘍、神経芽細胞腫あるいは大腸癌である 7 に記載の抗癌剤。

9. c-Kit キナーゼを過剰発現する、あるいは変異型 c-Kit キナーゼを発現する癌が、急性骨髄性白血病、小細胞肺癌あるいは GIST である 7 に記載の抗癌剤。

10. 患者から取り出した癌細胞が c-Kit キナーゼを過剰発現する、あるいは変異型 c-Kit キナーゼを発現することを確認した後に投与することの特徴とする、7～9 いずれか 1 項に記載の抗癌剤。

11. 1～6 いずれか 1 項に記載の c-Kit キナーゼ阻害剤を有効成分とする、肥満細胞症、アレルギーあるいは喘息の治療剤。

【0014】

【発明の実施の形態】

以下に本発明の実施の形態について説明する。

【0015】

本明細書中においては、化合物の構造式が便宜上一定の異性体を表すことがあるが、本発明には化合物の構造上生ずる全ての、幾何異性体、不斉炭素に基づく光学異性体、立体異性体、互変異性体などの総ての異性体および異性体混合物を含み、便宜上の式の記載に限定されるものではない。また、本発明化合物が生体内で酸化、還元、加水分解、抱合などの代謝を受けてなお所望の活性を示す化合物をも包含し、さらに本発明は生体内で酸化、還元、加水分解などの代謝を受けて本発明化合物を生成する化合物をも包含する。さらに、水をはじめとする溶媒和物も本発明に含まれる。

【0016】

本明細書中において「C<sub>1-6</sub> アルキル基」とは、炭素数 1～6 の直鎖もしくは分枝鎖状のアルキル基を示し、具体的には例えばメチル基、エチル基、n-プロピル基、i-プロピル基、n-ブチル基、i-ブチル基、sec-ブチル基、t-ブチル基、n-ペンチル基、i-ペンチル基、sec-ペンチル基、t-ペンチル基、ネオペンチル基、1-メチルブチル基、2-メチルブチル基、1, 1-ジメチルプロピル基、1, 2-ジメチルプロピル基、n-ヘキシル基、i-ヘキシル基、1-メチルペンチル基、2-メチルペンチル基、3-メチルペンチル基、1, 1-ジメチルブチル基、1, 2-ジメチルブチル基、2, 2-ジメチルブチル基、1, 3-ジメチルブチル基、2, 3-ジメチルブチル基、3, 3-ジメチルブチル基、1-エチルブチル基、2-エチルブチル基、1, 1, 2-トリメチルプロピル基、1, 2, 2-トリメチルプロピル基、1-エチル-1-メチルプロピル基、1-エチル-2-メチルプロピル基などが挙げられ、好ましくは、メチル基、エチル基、n-プロピル基、i-プロピル基、n-ブチル基、i-ブチル基、sec-ブチル基、t-ブチル基、n-ペンチル基、i-ペンチル基



、sec-ペンチル基、t-ペンチル基、ネオペンチル基、1-メチルブチル基、2-メチルブチル基、1, 1-ジメチルプロピル基、1, 2-ジメチルプロピル基、n-ヘキシル基、i-ヘキシル基であり、より好ましくは、メチル基、エチル基、n-プロピル基、i-プロピル基、n-ブチル基、i-ブチル基、sec-ブチル基、t-ブチル基、n-ペンチル基、i-ペンチル基、sec-ペンチル基、t-ペンチル基、ネオペンチル基、1-メチルブチル基、2-メチルブチル基、1, 1-ジメチルプロピル基、1, 2-ジメチルプロピル基、さらに好ましくはメチル基、エチル基、n-プロピル基、i-プロピル基、n-ブチル基、i-ブチル基、sec-ブチル基、t-ブチル基であり、もっとも好ましくはメチル基、エチル基、n-プロピル基、i-プロピル基である。

#### 【0017】

本明細書中において「C<sub>3-8</sub>のシクロアルキル基」とは、炭素数3～8の環状のアルキル基を意味し、具体的には例えば、シクロプロピル基、シクロブチル基、シクロペンチル基、シクロヘキシル基が挙げられる。好ましくはシクロプロピル基である。

#### 【0018】

本明細書中において「C<sub>1-6</sub>アルコキシ基」とは、酸素原子に前記「C<sub>1-6</sub>アルキル基」が結合した置換基を意味し、具体的には例えばメトキシ基、エトキシ基、n-プロポキシ基、i-プロポキシ基、n-ブトキシ基、i-ブトキシ基、sec-ブトキシ基、t-ブトキシ基、n-ペンチルオキシ基、i-ペンチルオキシ基、sec-ペンチルオキシ基、t-ペンチルオキシ基、ネオペンチルオキシ基、1-メチルブトキシ基、2-メチルブトキシ基、1, 1-ジメチルプロポキシ基、1, 2-ジメチルプロポキシ基、n-ヘキシルオキシ基、i-ヘキシルオキシ基、1-メチルペンチルオキシ基、2-メチルペンチルオキシ基、3-メチルペンチルオキシ基、1, 1-ジメチルブトキシ基、1, 2-ジメチルブトキシ基、2, 2-ジメチルブトキシ基、1, 3-ジメチルブトキシ基、2, 3-ジメチルブトキシ基、3, 3-ジメチルブトキシ基、1-エチルブトキシ基、2-エチルブトキシ基、1, 1, 2-トリメチルプロポキシ基、1, 2, 2-トリメチルプロポキシ基、1-エチル-1-メチルプロポキシ基、1-エチル-2

ーメチルプロポキシ基などが挙げられ、好ましくはメトキシ基、エトキシ基、*n*-プロポキシ基、*i*-プロポキシ基、*n*-ブトキシ基、*i*-ブトキシ基、*sec*-ブトキシ基、*t*-ブトキシ基、*n*-ペンチルオキシ基、*i*-ペンチルオキシ基、*sec*-ペンチルオキシ基、*t*-ペンチルオキシ基、ネオペンチルオキシ基、1-メチルブトキシ基、2-メチルブトキシ基、1, 1-ジメチルプロポキシ基、1, 2-ジメチルプロポキシ基、*n*-ヘキシルオキシ基、*i*-ヘキシルオキシ基であり、より好ましくはメトキシ基、エトキシ基、*n*-プロポキシ基、*i*-プロポキシ基、*n*-ブトキシ基、*i*-ブトキシ基、*sec*-ブトキシ基、*t*-ブトキシ基、*n*-ペンチルオキシ基、*i*-ペンチルオキシ基、*sec*-ペンチルオキシ基、*t*-ペンチルオキシ基、ネオペンチルオキシ基、1-メチルブトキシ基、2-メチルブトキシ基、1, 1-ジメチルプロポキシ基、1, 2-ジメチルプロポキシ基、さらに好ましくはメトキシ基、エトキシ基、*n*-プロポキシ基、*i*-プロポキシ基、*n*-ブトキシ基、*i*-ブトキシ基、*sec*-ブトキシ基、*t*-ブトキシ基、もっとも好ましくはメトキシ基、エトキシ基、*n*-プロポキシ基、*i*-プロポキシ基である。

#### 【0019】

本明細書中において「C<sub>3</sub> - 8 のシクロアルコキシ基」とは、炭素数3～8の環状のアルコキシ基を意味し、具体的には例えば、シクロプロポキシ基、シクロブトキシ基、シクロペンチルオキシ基、シクロヘキシルオキシ基が挙げられる。好ましくはシクロプロポキシ基である。

#### 【0020】

本発明に関する式 (I) 記載の化合物は種々の方法によって製造することができる。例えば、特許文献3にそのいくつかが具体的に開示されている。

#### 【0021】

本明細書中において「薬理学的に許容できる塩」としては、特に種類は限定されないが、たとえば塩酸塩、硫酸塩、炭酸塩、重炭酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩などの無機酸の付加塩；酢酸塩、マレイン酸塩、乳酸塩、酒石酸塩、トリフルオロ酢酸塩などの有機カルボン酸の付加塩；メタンスルホン酸塩、ヒドロキシメタンスルホン酸塩、ヒドロキシエタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸

塩、トルエンスルホン酸塩、タウリン塩などの有機スルホン酸の付加塩；トリメチルアミン塩、トリエチルアミン塩、ピリジン塩、プロカイン塩、ピコリン塩、ジシクロヘキシルアミン塩、N, N' -ジベンジルエチレンジアミン塩、N-メチルグルカミン塩、ジエタノールアミン塩、トリエタノールアミン塩、トリス（ヒドロキシメチルアミノ）メタン塩、フェネチルベンジルアミン塩などのアミンの付加塩；アルギニン塩、リジン塩、セリン塩、グリシン塩、アスパラギン酸塩、グルタミン酸塩などのアミノ酸の付加塩などを挙げることができる。

#### 【0 0 2 2】

本発明に係る医薬の投与量は症状の程度、年齢、性別、体重、投与形態、疾患の種類などにより異なるが、通常成人 1 日当たり  $100\mu\text{g}$  ～  $10\text{g}$  であり、1～数回に分けて投与される。

本発明に係る医薬の投与形態は特に限定されず、通常用いられる方法により経口または非経口的に投与することができる。

#### 【0 0 2 3】

これら製剤化には通常用いられる賦形剤，結合剤，滑沢剤，着色剤，矯味矯臭剤など、および必要により安定化剤，乳化剤，吸収促進剤，界面活性剤などを使用することができ、一般に医薬品製剤の原料として用いられる成分を配合して常法により製剤化される。

これらの成分としては例えば、動植物油（大豆油、牛脂、合成グリセライドなど）、炭化水素（流動パラフィン、スクワラン、固形パラフィンなど）、エステル油（ミリスチン酸オクチルドデシル、ミリスチン酸イソプロピルなど）、高級アルコール（セトステアリルアルコール、ベヘニルアルコールなど）、シリコン樹脂、シリコン油、界面活性剤（ポリオキシエチレン脂肪酸エステル、ソルビタン脂肪酸エステル、グリセリン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレン硬化ひまし油、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンブロックコポリマーなど）、水溶性高分子（ヒドロキシエチルセルロース、ポリアクリル酸、カルボキシビニルポリマー、ポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、メチルセルロースなど）、アルコール（エタノール、イソプロパノールなど）、多価アルコール（グリセリン、プロピレングリコー

ル、ジプロピレングリコール、ソルビトールなど）、糖（グルコース、ショ糖など）、無機粉体（無水ケイ酸、ケイ酸アルミニウムマグネシウム、ケイ酸アルミニウムなど）、精製水などが挙げられる。pH調製のためには無機酸（塩酸、りん酸など）、無機酸のアルカリ金属塩（りん酸ナトリウムなど）、無機塩基（水酸化ナトリウムなど）、有機酸（低級脂肪酸、クエン酸、乳酸など）、有機酸のアルカリ金属塩（クエン酸ナトリウム、乳酸ナトリウムなど）、有機塩基（アルギニン、エタノールアミンなど）などを用いることができる。また、必要に応じて、防腐剤、抗酸化剤などを添加することができる。

#### 【発明の効果】

強いc-Kitキナーゼ阻害活性を示す化合物が見出され、c-Kitキナーゼの活性化が原因と考えられる、ある種の癌の癌化や悪性化を抑制する治療剤、あるいはc-Kitキナーゼが原因と考えられるMastcytosis、アレルギー、喘息などの疾患に対する治療剤が可能となった。

#### 【0024】

#### 【実施例】

以下に、具体的な例をもって本発明を示すが、本発明はこれに限られるものではない。

#### 【実施例1】 SCF刺激の細胞増殖に対する影響

c-Kitキナーゼを発現している小細胞肺癌細胞株H526（ATCCより購入、CRL-5811）の増殖に対する下記の化合物1、化合物2、化合物3および化合物4（構造式は化3に記載）の影響を調べた。

化合物1：4-（3-クロロ-4-（シクロプロピルアミノカルボニル）アミノフェノキシ）-7-メトキシ-6-キノリンカルボキサミド

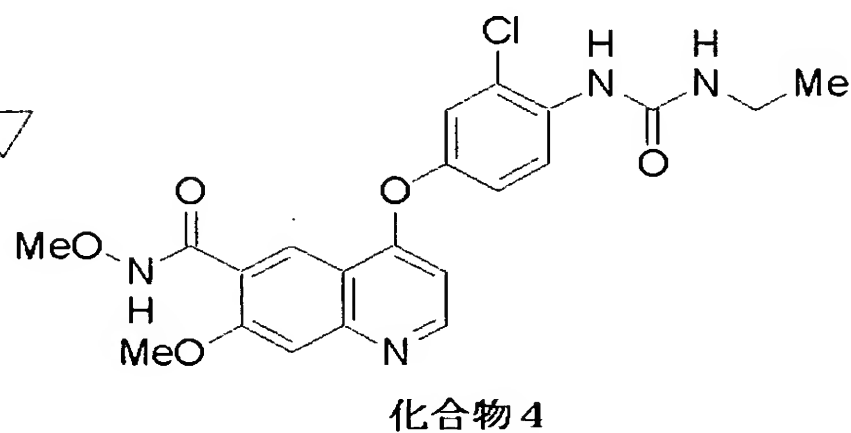
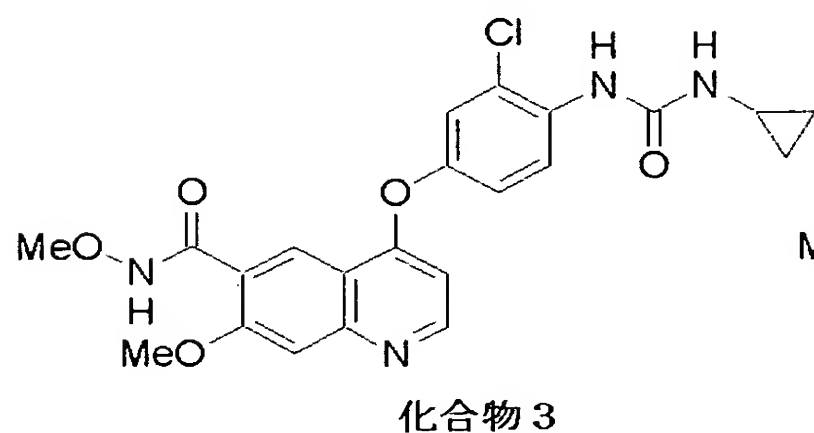
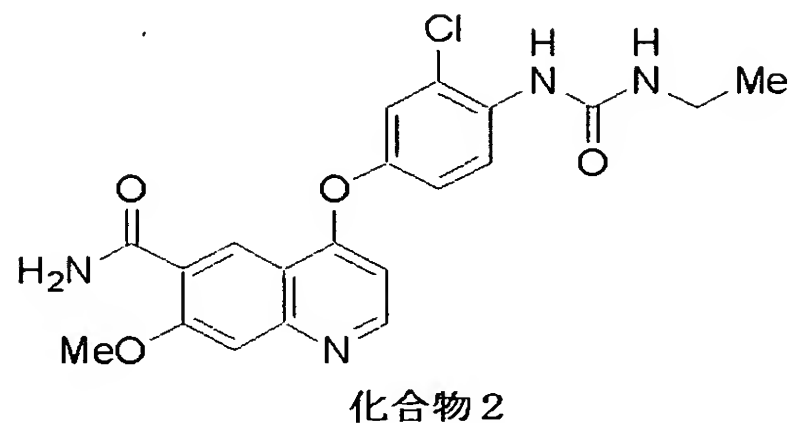
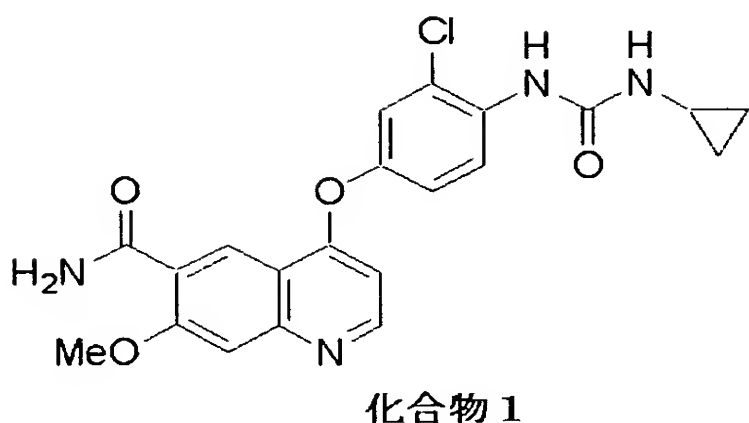
化合物2：4-（3-クロロ-4-（エチルアミノカルボニル）アミノフェノキシ）-7-メトキシ-6-キノリンカルボキサミド

化合物3：N6-メトキシ-4-（3-クロロ-4-（（シクロプロピルアミノ）カルボニル）アミノ）フェノキシ-7-メトキシ-6-キノリンカルボキサミド

化合物4：N6-メトキシ-4-（3-クロロ-4-（（エチルアミノ）カル

ボニル) アミノ) フェノキシ) —7-メトキシ—6-キノリンカルボキサミド

【化5】



【0025】

H526は、10% FCS (Cell Culture Technologies社より購入) を含むRPMI1640培地 (日水製薬株式会社製) で5% CO<sub>2</sub>インキュベーター (37℃) で培養した。培養後、H526細胞をPBS で3回洗浄し、0.1% BSA (Sigma 社製) を含むRPMI1640培地 (以下、BSA-RPMI1640) で $1.0 \times 10^5$  cells/mlに懸濁し、この細胞懸濁液を50  $\mu$ lずつ丸底96ウェルプレートに播種して、5% CO<sub>2</sub>インキュベーター (37℃) で一晩培養した。一晩培養後、200 ng/ml SCF (R & D 社製) を含むBSA-RPMI1640 50  $\mu$ l、及び希釈した被検物質を含むBSA-RPMI1640 100  $\mu$ lを添加した。

被検物質添加開始日より7日目に、Cell Counting Kit-8 (同仁化学研究所製) 20  $\mu$ lを加え、5% CO<sub>2</sub>インキュベーター (37℃) で約2時間培養した。発色後、測定波長 450 nm、対照波長 660 nm で各ウェルの吸光度をプレートリーダー MTP-32 (コロナ電気社製) を用いて測定した。各ウェルの吸光度をSCFを添加していないウェルの吸光度で引き、被検物質を添加していないウェルの吸光度に対する、被検物質を添加したウェルの吸光度の比を求め、この比の値から細胞増殖を50 %阻害するのに必要な被検物質の濃度 (IC<sub>50</sub>) を求めた。

【0026】

その結果下表に示す通り、化合物 1、化合物 2、化合物 3 及び化合物 4 は、SCF で刺激される細胞増殖を抑制し、c-Kit キナーゼ阻害活性を有していると考えられた。また、非特許文献 3 9 に記載の化合物 KRN633 の IC<sub>50</sub> は 301 nM で、化合物 1、化合物 2、化合物 3 及び化合物 4 と比較して、弱い活性しか示さなかった。

【表 1】

化合物	IC <sub>50</sub> (nM)
化合物 1	9.36
化合物 2	12.8
化合物 3	214
化合物 4	56.3

## 【0 0 2 7】

[実施例 2] SCF 刺激による c-Kit キナーゼリン酸化に対する化合物 1 の影響

c-Kit キナーゼ発現小細胞肺癌細胞株 H526 細胞 c-Kit キナーゼ分子の、SCF 刺激によるリン酸化に対する化合物 1 の影響を調べた。

H526 は、10% FCS を含む RPMI1640 培地で 5% CO<sub>2</sub> インキュベーター (37℃) で培養した。培養後、H526 細胞を PBS で 3 回洗浄し、BSA-RPMI1640 で  $5.0 \times 10^5$  cells/ml に懸濁し、この細胞懸濁液を 1 ml ずつ 24 ウェルプレートに播種して、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター (37℃) で 6 時間培養した。6 時間培養後、希釈した被検物質を含む BSA-RPMI1640 1 ml を添加し 5% CO<sub>2</sub> インキュベーター (37℃) で 1 時間培養した後、10 µg/ml SCF (R & D 社製) 10 µl を添加して、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター (37℃) で更に 5 分間培養した。5 分間培養後、PBS で洗浄し、SDS サンプルローディングバッファー 100 µl を添加して cell lysate サンプルを調整し、94℃・10 分間熱処理を行った後 -20℃ で凍結保存した。

その後、cell lysate サンプル 20 µl を 4-20% gradient polyacrylamide gel (第一化学薬品株式会社製) で電気泳動を行った。泳動後、PVDF membrane (Amersham pharmacia biotech 社製) に 3 時間でトランスファーし、トランスファーしたメンブレンを、1 次抗体として phospho-c-kit (Tyr719) antibody (Cell Signaling 社製)、2 次抗体として anti-rabbit IgG, HRP-linked antibody (Cell Signaling 社製) を用いてイムノブロットを行った。メンブレンを洗浄後、Supe

r Signal (PIERCE 社製) で発色させた。

その結果、図 1 に示す通り、SCF非存在下ではc-Kitキナーゼはリン酸化されず(一番左のレーン)、SCFの存在下で起こるc-Kitキナーゼのリン酸化は、化合物 1 の添加により濃度依存的に抑制された。

#### 【 0 0 2 8 】

[実施例 3] ヌードマウスに移植したH562腫瘍増殖に対する化合物 1 の影響

H526は、10% FCSを含むRPMI1640培地で5% CO<sub>2</sub>インキュベーター (37℃) で培養した。培養液を回収後、PBSで2回洗浄し、PBSで $5.0 \times 10^7$  cells/mlに懸濁した。この細胞懸濁液を6週齢の雌 Balb/c nu/nu mice (チャールズリバー社より購入) の右脇腹皮下部に0.1 mlで移植した。移植後、腫瘍体積が約150 mm<sup>3</sup>になった時点から、被検物質の投与を開始し、1日2回、14日間の経口投与を行った。被検物質は0.1 ml/10 g体重の投与量になるように、0.5%メチルセルロース (和光純薬工業株式会社製) 溶液に懸濁した。

投与期間中に、1週間に2回、腫瘍体積をキャリパーで測定した。腫瘍体積はキャリパーで腫瘍の長径と短径を測定し、 $1/2 \times \text{長径} \times \text{短径} \times \text{短径}$ で計算した。なお、実験はビークルコントロール群 (溶媒投与群) を10匹、被検物質投与群を1群5匹で行った。

その結果、図 2 に示す通り、化合物 1 は用量依存的にヌードマウスに移植したでのH526腫瘍の増殖を抑制した。

#### 【 0 0 2 9 】

[実施例 4] In vivoにおけるc-Kitキナーゼ のリン酸化

$5.0 \times 10^7$  cells/mlの濃度に調製したH526の細胞懸濁液0.1 mlを、6週齢の雌Balb/c nu/nu mice (チャールズリバー社より購入) の右脇腹皮下部に移植した後、腫瘍体積が300~1000 mm<sup>3</sup>になった時点で、ビークルコントロール群 (溶媒投与群) と被検物質投与群に分けて被検物質の投与を行った。摘出した腫瘍をcell lysate buffer (50 mM HEPES (pH7.4), 150 mM NaCl, 10% glycerol, 1% Triton X-100, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 100 mM NaF, 1 mM PMSF, 10 μg/ml aprotinin, 50 μg/ml leupeptin, 1 μg/ml pepstatin A, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 25 mM β-glycerophosphate, phosphatase inhibitor cocktail II) に入れてホモジナイズした。

遠心した後に上清をタンパク定量し、3×SDS サンプルローディングバッファーを添加してcell lysateサンプルを作った。その後、cell lysateサンプルを94℃・10分間熱処理をし、-20℃で凍結保存した。その後、タンパク量として30 $\mu$ g相当のcell lysateサンプルを4-20% gradient polyacrylamide gel（第一化学薬品株式会社製）で電気泳動を行った。泳動後、PVDF membrane（Amersham pharmacia biotech 社製）に3時間でトランスファーしたメンブレンを、1次抗体としてphospho-c-kit (Tyr719) antibody（Cell Signaling 社製）、2次抗体としてanti-rabbit IgG, HRP-linked antibody（Cell Signaling 社製）を用いてイムノブロットを行った。メンブレンを洗浄後、Super Signal（PIERCE 社製）で発色させた。

その結果、

【0 0 3 0】

【図面の簡単な説明】

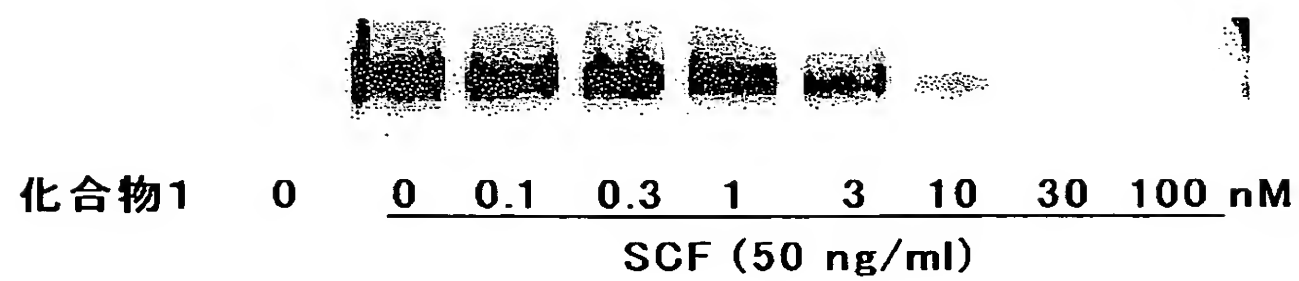
【図 1】 SCF刺激によるc-Kitキナーゼのリン酸化に対する化合物 1 の影響

【図 2】 ノードマウスに移植したH562腫瘍増殖に対する化合物 1 の影響

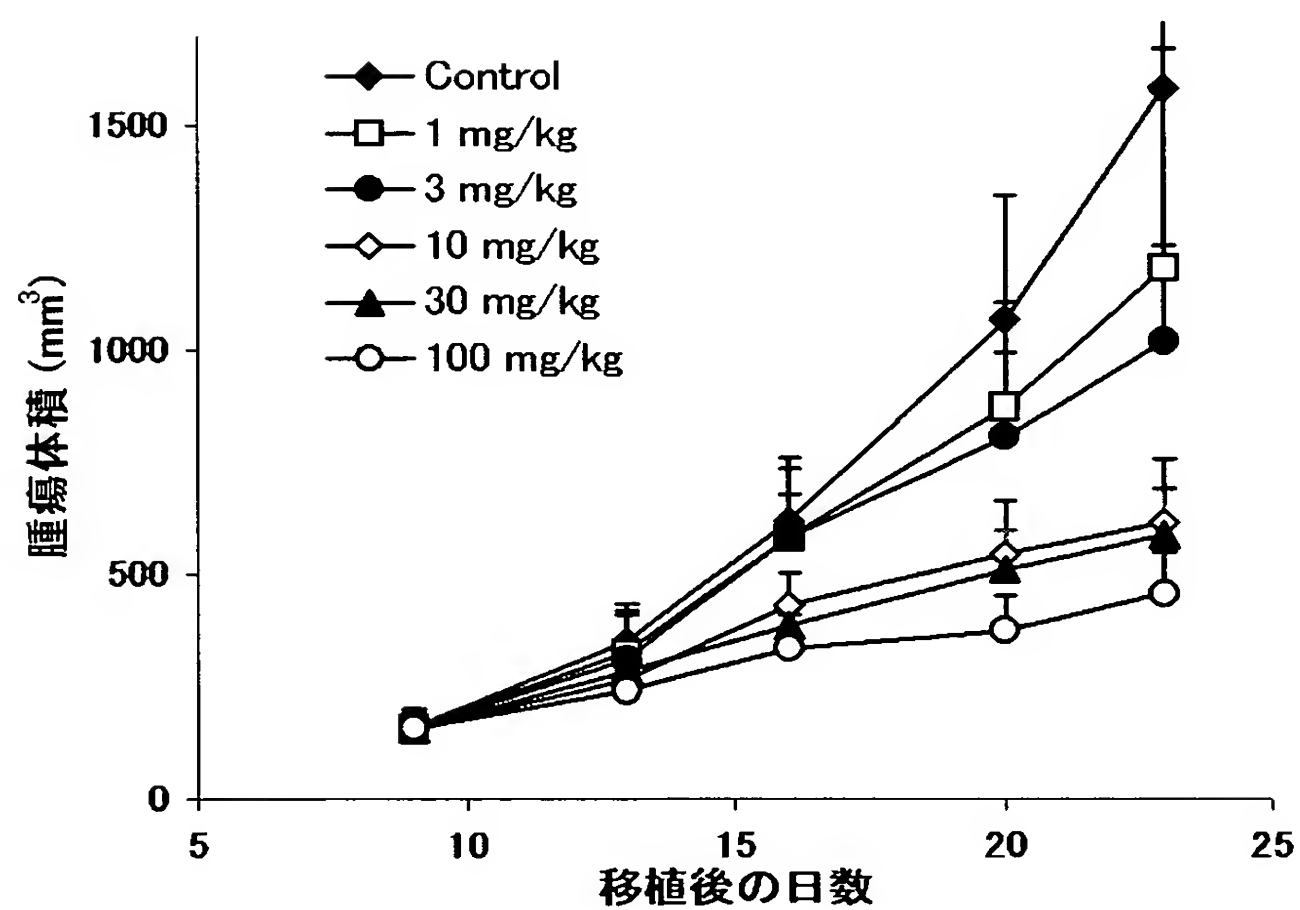


【書類名】 図面

【図 1】



【図 2】



**【書類名】 要約書****【要約】**

**【課題】** c-Kitキナーゼ阻害活性を示す新たな化合物を見出し、c-Kitキナーゼの活性化が原因と考えられる、ある種の癌の癌化や悪性化を抑制する治療剤、あるいはc-Kitキナーゼが原因と考えられる肥満細胞症、アレルギー、喘息などの疾患に対する治療剤を開発することにある。

**【解決手段】** 化1に記載の化合物が強いc-Kitキナーゼ阻害活性を示し、in vitro及びin vivoでc-Kitキナーゼが活性化した癌細胞の増殖を抑制することが見出された。c-Kitキナーゼ阻害活性を示す新たな抗癌剤が見出された。

**【選択図】** なし

特願 2 0 0 3 - 0 6 2 8 2 3

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [ 0 0 0 0 0 0 2 1 7 ]

1. 変更年月日	1 9 9 0 年 8 月 2 9 日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都文京区小石川 4 丁目 6 番 1 0 号
氏 名	エーザイ株式会社